

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-236884

(43)Date of publication of application : 05.09.2000

51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 31/00
A61K 39/395
A61K 48/00
C07K 16/24
C12P 21/08

21)Application number : 11-177846

(71)Applicant : HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC

22)Date of filing : 24.06.1999

(72)Inventor : NISHIDA TAKEHIRO
OKURA TAKANORI
TANIMOTO TADAO
KURIMOTO MASASHI

30)Priority

Priority number : 10177580	Priority date : 24.06.1998	Priority country : JP
10289044	12.10.1998	
10365023	22.12.1998	JP
		JP

54) PEPTIDE

57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new artificial peptide which has at least a part of an amino acid sequence of a variable region of an antiinterleukin-18 antibody, has a property of neutralizing a physiological effect of interleukin-18, and can be used for suppressing immunological reactions, and so on.

SOLUTION: This is a new artificial peptide which has at least a part of an amino acid sequence of a variable region in antiinterleukin-18 antibody, has a property of neutralizing a physiological effect of interleukin-18, and can be used as medicines for autoimmune diseases, an immunological suppressor, an antiinflammatory agent, and so on. The peptide is obtained, using cDNA obtained in the process where the amino acid sequence of antiinterleukin-18 antibody is determined as a material, by linking a base sequence coding for a part containing a variable region or CDR of the antibody by the PCR method, or the like, via a base sequence coding for a proper heterologous amino acid sequence, incorporating the obtained DNA into a vector, transducing the obtained vector into a host cell for transformation, followed by culturing the obtained transformant for expression.

LEGAL STATUS

Date of request for examination]

Date of sending the examiner's decision of rejection]

Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

Date of final disposal for application]

Patent number]

Date of registration]

Number of appeal against examiner's decision of rejection]

Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-236884
(P2000-236884A)

(43)公開日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	サーチト(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/00	6 3 7	A 6 1 K 31/00	6 3 7 D 4 B 0 6 4
39/395		39/395	U 4 C 0 8 4
48/00		48/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/24		C 0 7 K 16/24	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全 31 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平11-177846

(22)出願日 平成11年6月24日(1999.6.24)

(31)優先権主張番号 特願平10-177580

(32)優先日 平成10年6月24日(1998.6.24)

(33)優先権主張国 日本(J P)

(31)優先権主張番号 特願平10-289044

(32)優先日 平成10年10月12日(1998.10.12)

(33)優先権主張国 日本(J P)

(31)優先権主張番号 特願平10-365023

(32)優先日 平成10年12月22日(1998.12.22)

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000153908
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72)発明者 西田 毅弘
岡山県岡山市国富4丁目2番41-2号

(72)発明者 大倉 隆則
岡山県倉敷市児島下の町10丁目376番地の210

(72)発明者 谷本 忠雄
岡山県岡山市山崎312番地の88

(72)発明者 栗本 雅司
岡山県岡山市伊福町3丁目28番5号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ペプチド

(57)【要約】

【課題】 ヒトに投与してインターロイキン-18の生理作用を効果的に中和する物質の提供を課題とする。

【解決手段】 抗インターロイキン-18抗体における相補性決定領域のアミノ酸配列の一部又は全てを含有し、インターロイキン-18の生理作用を中和する性質を具備する人為的に創製されたペプチドを提供することによって解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗インターロイキン-18抗体における可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを含有し、インターロイキン-18の生理作用を中和する性質を具備する人為的に創製されたペプチド。

【請求項2】 抗インターロイキン-18抗体が単クローン抗体である請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】 抗インターロイキン-18抗体がヒト又はマウス由来のインターロイキン-18を抗原とする請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項4】 インターロイキン-18の生理作用による炎症の惹起を抑制する請求項1、2又は3に記載のペプチド。

【請求項5】 抗インターロイキン-18抗体の可変領域が配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列を含有する請求項1乃至4のいずれかに記載のペプチド。

【請求項6】 抗インターロイキン-18抗体の可変領域における相補性決定領域のアミノ酸配列の一部又は全てのアミノ酸配列を含有する請求項1乃至5のいずれかに記載のペプチド。

【請求項7】 配列表における配列番号3乃至8に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する請求項1乃至6のいずれかに記載のペプチド。

【請求項8】 配列表における配列番号9又は10に示すアミノ酸配列を有する請求項1乃至7のいずれかに記載のペプチド。

【請求項9】 ヒト化された単クローン抗体としての請求項1乃至8に記載のペプチド。

【請求項10】 請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドをコードするDNA。

【請求項11】 配列表における配列番号11及び12に示す塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列の一部又は全てを含有する請求項10に記載のDNA。

【請求項12】 配列表における配列番号13乃至18に示す塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列の一部又は全てを含有する請求項10又は11に記載のDNA。

【請求項13】 配列表における配列番号19又は20に示す塩基配列、又はそれらのいずれかに相補的な塩基配列を有する請求項10、11又は12に記載のDNA。

【請求項14】 遺伝子の縮重に基づき、コードするアミノ酸配列を変えることなく、1個又は2個以上の塩基を他の塩基で置換した請求項10、11、12又は13に記載のDNA。

【請求項15】 自律複製可能なベクターに挿入された請求項10乃至14のいずれかに記載のDNA。

【請求項16】 動物、植物又は微生物由来の宿主に導入された請求項10乃至15のいずれかに記載のDNA。

【請求項17】 請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドをコードするDNAを発現させる工程と、生成した

ペプチドを採取する工程を含んでなるペプチドの製造方法。

【請求項18】 生成したペプチドを塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動を含む工程により採取する請求項17に記載のペプチドの製造方法。

【請求項19】 有効成分として請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドを含んでなる感受性疾患剤。

【請求項20】 安定剤として血清アルブミン、ゼラチン、糖質及び／又は緩衝剤を含んでなる請求項19に記載の感受性疾患剤。

【請求項21】 抗自己免疫疾患剤としての請求項19又は20に記載の感受性疾患剤。

【請求項22】 免疫抑制剤としての請求項19又は20に記載の感受性疾患剤。

【請求項23】 抗炎症剤としての請求項19又は20に記載の感受性疾患剤。

【請求項24】 請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含んでなるインターロイキン-18中和剤。

【請求項25】 請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドを作用させることを特徴とするインターロイキン-18の中和方法。

【請求項26】 請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含んでなるインターロイキン-18阻害剤。

【請求項27】 請求項1乃至9のいずれかに記載のペプチドを作用させることを特徴とするインターロイキン-18の阻害方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は新規な生理活性ペプチドに関するものであり、詳細には、インターロイキン-18の生理作用を中和する、人為的に創製されたペプチドに関するものである。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン-18（以下、「IL-18」と略記する。）は、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの一種である。IL-18は、特開平8-27189号公報、特許第2724987号掲載公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第378巻、第6,552号、88乃至91頁（1995年）に見られるように、発見当初、インターフェロン- γ 誘導因子（IGIF）として記載されていたが、その後、シンペイ・ウシオら『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第156巻、4,274乃至4,279頁（1

996年)における提案にしたがって、「IL-18」と呼称されるようになった。成熟型のIL-18は157個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有し、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロナー(以下、「IFN- γ 」と略記する。)の産生を誘導する性質と、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞の生成を誘導する性質を兼備している。これらの性質故に、IL-18は抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、抗免疫疾患剤などの医薬品として広範な用途が期待され、鋭意研究が進められている。なお、配列表における配列番号21及び22には、それぞれ、ヒト及びマウスの成熟型のIL-18のアミノ酸配列が示されている。

【0003】前述のとおり、IL-18にかぎらず、サイトカインは、本来、免疫系における情報伝達を担う物質として産生され、分泌される。正常に機能している免疫系は、サイトカインが本来あるべきタイミングで分泌され、然るべき細胞に情報を伝達することによって制御されていると考えられる。これによって免疫系は、病原菌やウイルスなど異物の侵入や腫瘍細胞など異物の発生に対して適切に作動することができる。これに対し、サイトカインが生体内で過剰に産生されたり、外部から過剰に投与されたりすると、免疫系のバランスに片寄りを生じ、生体に諸種の悪影響を及ぼす場合がある。例えば、マサノリ・カワシマら、『リウマトロジー・イン・ヨーロッパ、ジャーナル・フォー・エデュケーション・アンド・インフォメーション・イン・リウマトロジー』、第26巻、増補2号、77頁(1997年)における、自己免疫疾患の患者の体液に特異的に高いレベルのIL-18が認められたとの報告は、自己免疫疾患などの炎症性の疾患の発症と、IL-18の生体内での過剰な産生との関連を示唆している。したがって、IL-18関連疾患を治療・予防する医薬品を開発するためには、IL-18そのものの生理作用の解明とともに、IL-18の生理作用を効果的に中和ないし阻害し、ヒトへ投与し得る物質が確立され量産されることが不可欠である。

【0004】ところで、個々のサイトカインに対する中和物質の確立ないし創製が、近年斯界において精力的に試みられている。有効な物質として期待されるものには、サイトカインに対する中和抗体、可溶性のサイトカイン受容体及びサイトカインのアンタゴニスト等がある。これらのうちで、中和抗体は、標的となるサイトカインに対する特異性の高さや中和能の高さ故に、ひときわ強い期待が寄せられている。しかしながら従来の慣用の技術により得られる抗体の多くはヒト以外の哺乳類起源である。それ故、ヒトに対して抗原性を示し、投与されたヒトの免疫系により速やかに排除される場合があり、反復投与が必ずしも奏効しないという問題がある。また、斯かる抗体はヒトに投与すると、拒絶反応やアナ

フィラキシー等の副作用を惹起する場合もある。一方、これらの、抗体の抱える問題点を解決するための方策もいくつか提案されてはいるものの、いずれも汎用化されていると言える状況にはなく、ごく限られたサイトカインの中和物質の報告例が僅かに認められるに過ぎない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、ヒトを含む哺乳類に投与して、IL-18の生理作用を効果的に中和する物質を提供することにある。

【0006】この発明の第二の課題は、斯かる物質をコードするDNAを提供することにある。

【0007】この発明の第三の課題は、斯かる物質の製造方法を提供することにある。

【0008】この発明の第四の課題は、斯かる物質の感受性疾患剤としての用途を提供するものである。

【0009】この発明の第五の課題は、斯かる物質のIL-18中和剤としての用途を提供することにある。

【0010】この発明の第六の課題は、斯かる物質を用いるIL-18の中和方法を提供することにある。

【0011】この発明の第七の課題は、斯かる物質のIL-18阻害剤としての用途を提供することにある。

【0012】この発明の第八の課題は、斯かる物質を用いるIL-18の阻害方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者がこれらの課題を解決すべく、抗IL-18抗体に着目し、先ずはじめに、その可変領域のアミノ酸配列を決定するとともに、そのアミノ酸配列の一部又は全てを含有する種々のペプチドを人為的に創製した。その結果、その創製されたペプチドが特異的にIL-18に結合し、極めて効果的にIL-18を中和するという独自の知見を得た。そして、斯かる創製されたペプチドは、過剰な免疫反応に起因する、自己免疫疾患など炎症性の疾患や免疫不全症をはじめとする種々の疾患の治療・予防に奏効することが判明した。斯かる創製されたペプチドは、それをコードするDNAを用いて所望量を製造できることも確認された。この発明は以上の知見に基づき完成されたものである。

【0014】すなわち、この発明は前記第一の課題を、抗IL-18抗体における可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを含有し、かつ、IL-18の生理作用を中和する性質を具備する人為的に創製されたペプチドにより解決するものである。

【0015】この発明は、前記第二の課題を、斯かるペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

【0016】この発明は、前記第三の課題を、斯かるペプチドをコードするDNAを発現させる工程と、生成されるペプチドを採取する工程を含んでなる、ペプチドの製造方法により解決するものである。

【0017】この発明は、前記第四の課題を、斯かるペプチドを有効成分として含んでなる感受性疾患剤により解決するものである。

【0018】この発明は、前記第五の課題を、斯かるペプチドを有効成分として含んでなるIL-18中和剤により解決するものである。

【0019】この発明は、前記第六の課題を、斯かるペプチドを作用させることを特徴とするIL-18の中和方法により解決するものである。

【0020】この発明は、前記第七の課題を、斯かるペプチドを有効成分として含んでなるIL-18阻害剤により解決するものである。

【0021】この発明は、前記第八の課題を、斯かるペプチドを作用させることを特徴とするIL-18の阻害方法により解決するものである。

【0022】

【発明の実施の形態】この発明は、抗IL-18抗体における可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを含有し、IL-18の生理作用を中和する（以下、単に「IL-18を中和する」と言う場合がある。）性質を具備する、人為的に創製されたペプチドに関するものである。この発明でいう抗IL-18抗体とは、通常、IL-18で免疫感作した哺乳動物の抗体産生細胞により産生される、IL-18を認識するイムノグロブリンであり、その起源やクラス、抗原としてのIL-18の起源は問わない。

【0023】いずれのクラスに属するいずれの起源の抗体も、一般に、2本の軽鎖と2本の重鎖がS-S結合を介して連結された構造の基本単位からなる。軽鎖及び重鎖ともに、N末端部のおよそ110アミノ酸からなる配列は抗体ごとに多様性が認められるが、それ以外の部分は同種抗体同士では比較的よく保存されている。前者は可変領域、後者は定常領域と呼ばれている。可変領域は、その中でもとりわけ抗体ごとに多様性の認められる部分と比較的保存された部分とにさらに分けられ、それぞれ、相補性決定領域（以下、「CDR」と言う。）及び枠組構造と呼ばれている。軽鎖及び重鎖の可変領域には、それぞれ4種類の枠組構造と3種類のCDRがあり、これらが交互に連結された構造をとっている。抗体と抗原との特異的結合にはこの可変領域が関わるが、そのうちで、とりわけCDRが深く関わっている。この発明のペプチドは、抗IL-18抗体における軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列の一部又は全て、あるいは、斯かる可変領域における6種類のCDRのアミノ酸配列の一部又は全てを含有する。

【0024】抗IL-18抗体におけるCDRを含む可変領域のアミノ酸配列は、通常以下のようにして決定される。まずはじめに、抗IL-18抗体を産生する細胞からRNAを調製する。斯かる抗体産生細胞として、同じ特許出願人による特開平8-217798号公報や特

開平8-231598号公報などに記載の方法により調製されるヒト又はマウスIL-18に対する単クローン抗体を産生するハイブリドーマを用いることができる。また、同じ特許出願人による特許第2724987号公報や特開平8-27189号公報などに記載の方法で得られる、ヒト又はマウスのIL-18を抗原に用いて常法にしたがい免疫感作した、通常、ヒト以外の哺乳動物から摘出・調製される脾細胞を当該抗体産生細胞として用いることもできる。ヒトからリンパ球を採取し、斯かるリンパ球を上記の如きIL-18で生体外で刺激して得られる細胞を当該抗体産生細胞として用いることもできる。調製されたRNAを用いて構築されるcDNAライブラリー、望ましくは、cDNA発現ライブラリーの検索や、斯かるRNAを鋳型とするRT-PCR法などにより、抗IL-18抗体をコードするcDNAをクローン化する。cDNA発現ライブラリーの構築と検索に関しては、エス・ポール監修、『メソッズ・イン・モレキュラー・バイオロジー』、第51巻、355乃至394頁、（1995年、ヒューマナ・プレス発行）には、その手法が詳述されている。クローン化されたcDNAの塩基配列を解読して抗IL-18抗体のCDRを含む可変領域のアミノ酸配列を決定することができる。因みに、後記実施例で詳述する抗IL-18単クローン抗体『#125-2HmAb』は、軽鎖における可変領域のアミノ酸配列として配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を、重鎖における可変領域のアミノ酸配列として配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列をそれぞれ含有している。また、斯かる軽鎖及び重鎖における3種類のCDRは、それぞれ、配列表における配列番号3乃至5及び6乃至8に示すアミノ酸配列を含有している。

【0025】この発明のペプチドは、以上に述べたような、抗IL-18抗体の可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを含有し、IL-18の生理作用を中和する性質を具備する、人為的に創製されてなるもの全般を包含し、天然物としてのIL-18中和抗体とは区別される。斯かるペプチドの、IL-18の生理作用を中和する性質は、例えば、後記実施例に詳述する、IL-18の生理作用のひとつである、免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生誘導に対する阻害能を試験する方法により確認することができる。斯かるペプチドは、通常、ヒト以外の哺乳類起源の抗体における定常領域のアミノ酸配列を完全には含有しない。なお、この発明でいうIL-18とは、それ単独の形態のものならびに、IL-18としてのアミノ酸配列、例えば、配列表における配列番号21又は22のいずれかに示すアミノ酸配列を含有する、IL-18同士が会合した二量体ないしはそれ以上の多量体の形態や、さらには、IL-18以外の物質、例えば、アルブミンなどの他の蛋白質と会合した複合体としての形態にあり、且つ、IL-18としての生理作

用を示す物質全般を意味する。

【0026】この発明のペプチドの具体的な形態としては、上述のごとき、抗IL-18抗体の可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを、必要に応じて適宜の異種のアミノ酸配列を介して連結させたペプチド、詳細には、抗IL-18抗体の軽鎖及び重鎖における可変領域のアミノ酸配列を適宜のリンカーとしての配列を介して連結した、いわゆる、「一本鎖可変領域断片」(以下、「scFv」と言う。)としてのペプチドや、斯かる可変領域もしくは、斯かる可変領域におけるCDRのアミノ酸配列を必要に応じてその周辺部のアミノ酸数個とともに、ヒト由来の抗体の対応部分に移植して連結した、ヒト化された単クローン抗体、いわゆる、「キメラ抗体」を含む「ヒト化抗体」が挙げられる。単クローン抗体『#125-2HmAb』のアミノ酸配列を利用する例としては、斯かる抗体における可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを、グリシン及びセリンからなるリンカーとしてのアミノ酸配列を介して連結した、配列表における配列番号9又は10に示すアミノ酸配列を有するscFvとしてのペプチドや、斯かる抗体における可変領域のアミノ酸配列の一部又は全てを含有するキメラ抗体としてのペプチド、さらには、斯かる抗体の可変領域におけるCDRとしての、配列表における配列番号3乃至8に示すアミノ酸配列の一部又は全てとともにヒト起源の枠組構造のアミノ酸配列の一部又は全てを含有するヒト化抗体としてのペプチドなどを挙げることができる。また、この発明のペプチドの別の形態としては、IL-18を中和する、天然物としての抗IL-18抗体の酵素的及び/又は化学的消化物、より具体的には、蛋白質分解酵素のパパイン又はペプシンで斯かる抗体を消化して得られる抗原結合断片(一般に「Fab」と略記される。)又は二量体の形態の抗原結合断片(一般に「F(ab')₂」と略記される。)としてのペプチドが挙げられる。

【0027】これらの形態のペプチドのうち、scFvや抗体の酵素的及び/又は化学的消化物としてのペプチドは、ヒトに投与した際の抗原性の主要な原因と考えられる、抗体における定常領域のアミノ酸配列を実質的に欠きながら、IL-18中和能を維持していることから、ヒトへの反復投与が奏効し易いという特徴がある。また、scFvとしてのペプチドは、分子量がもとの抗体に比べて低減されているためにヒトに投与した際の組織への浸透性に優れ、且つ、微生物を宿主とする形質転換体を用いる製造が容易なことから、安価に提供できるという利点もある。一方、キメラ抗体を含むヒト化抗体としてのペプチドは、抗原との結合に関わる部分以外は実質的にヒト起源であり、ヒトに対して抗原性を示し難く且つヒト体内でIL-18中和能を発揮する上、斯かるヒト化抗体は、ヒト体内の補体系を中心とする機構によってIL-18とともにヒト体内で速やかに除去され

る点で、もとの抗体に比べて優れた特徴を有している。

【0028】また、以上に例示されるようなアミノ酸配列と性質を有するペプチドに加えて、斯かるアミノ酸配列、すなわち、可変領域のアミノ酸配列やCDRのアミノ酸配列における一部のアミノ酸を他のアミノ酸で置換したり、他のアミノ酸を付加したり、さらには、一部のアミノ酸を欠失させることにより得られるアミノ酸配列を有するペプチドであっても、所期の性質を実質的に消失しないかぎりこの発明のペプチドに包含される。例えば、上記に例示されるアミノ酸配列におけるシステインの一又は複数を他のアミノ酸、望ましくは、グリシン、セリンなどの親水性アミノ酸やアラニン、バリンなどの疎水性アミノ酸で置換したり、斯かるシステインを含む数個のアミノ酸からなる部分を欠失させたアミノ酸配列を有するペプチドは、本来のアミノ酸配列を有するペプチドに比べて安定性が高まる場合があり有用である。また、上記に例示されるアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端に数個のヒスチジンを連結させると、所期の性質を維持しつつ、本来のアミノ酸配列を有するペプチドに比べてその精製が容易となる場合がある。さらに、当該ペプチドの薬効、体内動態、副作用、ヒトに対する抗原性及びIL-18中和能を含む生理作用や、安定性、IL-18に対する特異性・親和性などを改善するために、CDRのアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の最大30%、望ましくは、最大10%のアミノ酸を他のアミノ酸、例えば、物性や分子量の類似する他のアミノ酸などで置換して、斯かるCDRの一部のアミノ酸配列を含有するペプチドをさらに創製することもできる。したがって、斯様にアミノ酸が置換された、CDRのアミノ酸配列の一部を有するものであっても、この発明のペプチドに包含される。また、この発明のペプチドには、異なる2種類以上の抗IL-18抗体に由来する可変領域ないしはCDRのアミノ酸配列を適宜組合わせて含有してなるものであっても、それが所期の性質を具備する限り包含される。

【0029】この発明のペプチドは、通常、組換えDNA技術を応用して製造される。すなわち、この発明のペプチドは、当該ペプチドをコードするDNAを人為的に発現させ、生成したペプチドを採取して製造される。この発明は、当該ペプチドをコードするDNAに加えて、組換えDNA技術を用いる当該ペプチドの製造方法を提供するものでもあり、この発明の製造方法によるときには、所望量の当該ペプチドが容易に得られる。

【0030】この発明のペプチドをコードするDNAは、通常、上述のような、この発明で用いる抗IL-18抗体のアミノ酸配列を決定する過程で得られるcDNAを材料として、遺伝子工学的手法を適宜組み合わせて得ることができる。詳細には、斯かるcDNAにおける所望の塩基配列、例えば、可変領域やCDRを含む部分をコードする塩基配列を、発明の実施の形態に応じて選

択される、適宜の異種のアミノ酸配列をコードする塩基配列を介して連結する。塩基配列の連結は慣用のPCR法を適用して行うことができる。実施の形態がscFvとしてのペプチドの場合には、当該抗体における重鎖及び軽鎖それぞれの可変領域の一部又は全てに対する塩基配列を、適宜のリンカー、例えば、数個ないし数十個の、グリシンやセリンなどからなるアミノ酸配列をコードする塩基配列を介して連結する。その5'末端部に所望のシグナルペプチドをコードする塩基配列を連結することも随意である。実施の形態がキメラ抗体としてのペプチドの場合には、当該抗体における重鎖及び軽鎖それぞれの可変領域の一部又は全てに対する塩基配列を、公知のヒト起源の抗体における重鎖及び軽鎖の定常領域に対する塩基配列と連結する。実施の形態が、ヒト起源の枠組構造のアミノ酸配列の一部又は全てを含むヒト化抗体の場合には、当該抗体におけるCDRのアミノ酸配列と、必要に応じて、その周辺のアミノ酸数個を含む部分に対するDNAを、公知のヒト起源の抗体における可変領域に対する塩基配列に移植して連結する。斯かるヒト起源の抗体は、もとの抗IL-18抗体と同様の3次元構造を有するものが望ましい。この発明のDNAの具体例としては、配列表における配列番号9又は10に示すアミノ酸配列を有するこの発明のペプチドをコードする、それぞれ、配列表における配列番号19又は20に示す塩基配列を有するDNAが挙げられる。斯かるDNAは、先述の単クローン抗体『#125-2HmAb』を産生するハイブリドーマより得られるcDNAにおける、配列番号11の塩基配列の一部及び配列番号12の塩基配列を、グリシン及びセリンからなるアミノ酸配列コードする塩基配列を介して、PCR法を適用して連結することにより得ることができる。なお、ジェイ・エス・ヒューストンら、『プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ』、第85巻、5879乃至5883頁(1988年)、及びエル・ライチマンら、『ネイチャー』、第332巻、323乃至327頁(1988年)などには、それぞれ、scFv及び、キメラ抗体を含むヒト化抗体の基本的な手法に関する記載がある。

【0031】また、斯界においては一般に、あるペプチドをコードするDNAを人為的に発現させるに際し、そのDNAの発現効率を改善したり、あるいは、ペプチドそのものの物性を改善する目的で、DNAにおける塩基の1又は複数を他の塩基で置換したり、DNAに適宜の塩基配列を連結することがある。この発明のDNAにおいても斯かる変更は当然可能であり、具体的には、最終的に得られるペプチドが所期の性質を失わない範囲で、前述のごときこの発明のペプチドをコードするDNAにおける5'末端及び／又は3'末端に適宜の制限酵素による認識部位、開始コドン、終止コドン、プロモータ

ー、エンハンサーなどの塩基配列を連結し得ることは言うまでもない。したがって、この発明でいうDNAとは、前述のごときペプチドをコードするDNA、そのDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNA、さらには、それらのDNAがコードするアミノ酸配列を変更することなく、塩基の1又は複数を他の塩基で置換したDNAの全てを包含することとなる。

【0032】斯かるDNAは、微生物及び動植物由来の適宜の宿主に導入して発現させることができる。この発明のDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAはこの発明のDNAと複製可能なベクターを含んでなり、DNAさえ入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。この発明のDNAを挿入し得るベクターとしては、例えば、pET、pKK223-3、pcDNA1/Amp、BCMGSNeo、pcDL-SRα、pKY4、pSV2-neo、pSV-2gpt、pCDM8、pCEV4、pME18S、pEF-BOSなどのプラスミドベクターが挙げられる。複製可能なベクターは、通常、プロモーター、エンハンサー、複製起点、転写終結部位、スプライシング配列及び／又は選択配列などの、この発明のDNAが個々の宿主において発現するための適宜塩基配列を含んでなる。なお、プロモーターとして、例えば、熱ショック蛋白質プロモーターや、あるいは、同じ特許出願人による特開平7-163368号公報に開示されたインターフェロン-αプロモーターを用いるときには、形質転換体における当該DNAの発現を外部刺激により人為的に制御できることになる。

【0033】斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において慣用の方法が用いられる。具体的には、まず、この発明のDNAを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片を連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、AccI、BamHI、BstXI、EcoRI、HindIII、NotI、PstI、SacI、SalI、SmaI、SpeI、XbaI、XhoIなどを用いれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、微生物や動物由来の宿主において無限に複製可能である。

【0034】斯かる組換えDNAは、適宜宿主に導入して当該ペプチドの製造に用いられる。宿主としては、斯界において慣用される適宜の微生物や植物、脊椎動物及び無脊椎動物を含む動物に由来する細胞、さらには動物物体そのものを用いることができる。この発明のDNA

は、斯様な適宜の宿主に導入された形態のDNAをも包含する。この発明のペプチドをより安価に提供するためには、大腸菌や枯草菌などの微生物を宿主とするのが望ましい。この発明のペプチドの最終用途が医薬品である場合には、酵母や動物由来の宿主が比較的望ましい。動物由来の宿主細胞の具体例としては、例えば、3T3-Swiss albino細胞(ATCC CCL-92)、C127I細胞(ATCC CRL-1616)、CHO-K1細胞(ATCC CCL-61)、CV-1細胞(ATCC CCL-70)、COS-1細胞(ATCC CRL-1650)、HeLa細胞(ATCC CCL-2)、MOP-8細胞(ATCC CRL-1709)及びそれらの変異株を始めとする、ヒト、サル、マウス及びハムスター由来の上皮系細胞、間質系細胞及び造血系細胞が挙げられる。斯かる宿主にこの発明のDNAを導入するには、例えば、公知のDEAE-デキストラン法、磷酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、さらには、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどによるウイルス感染法などを用いればよい。斯くして得られる形質転換体から当該ペプチドを産生するクローンを選択するには、形質転換体を培養培地で培養し、当該ペプチドの産生が観察されたクローンを選択すればよい。なお、哺乳類由来の宿主細胞を用いる組換えDNA技術については、例えば、黒木登志夫、谷口克、押村光雄編集、『実験医学別冊細胞工学ハンドブック』、1992年、羊土社発行や横田崇、新井賢一編集、『実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ3 遺伝子クローニング実験法』、1993年、羊土社発行などにも詳述されている。

【0035】ところで、斯界においては、所望のDNAが上述のようにして得られている場合、斯かるDNAを適宜の動植物体に導入してなる、いわゆる、トランスジェニック動物やトランスジェニック植物を得ることは慣用となっている。この発明による、適宜の宿主に導入された形態のDNAには、斯かるトランスジェニック動物乃至トランスジェニック植物も包含される。トランスジェニック動物を得るには、概略としては、先ず、この発明のDNAを、必要に応じてプロモーターやエンハンサーなど所望の他のDNAとともに、宿主動物の種に応じて選択される適宜のベクターに組み込み、斯かる組換えDNAをマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法や当該DNAを含有する組換えウイルスの感染などにより、宿主として用いる動物の受精卵や胚性幹細胞に導入する。宿主動物としては、マウス、ラット、ハムスターなど実験動物として汎用される齧歯類のほか、山羊、羊、ブタ、牛などの家畜として常用される哺乳動物も飼育の容易さの点で有用である。次に、このようにして得られる、当該DNAの導入された細胞を、斯

かる細胞と同種の偽妊娠雌動物の卵管内又は子宮内に移植する。その後、自然分娩や帝王切開などにより生まれる新生児の中から、ハイブリダイゼーション法やPCR法などを適用してこの発明のDNAが導入されたトランスジェニック動物を選択すればよい。斯くしてこの発明のDNAを導入してなるトランスジェニック動物は得ることができる。なお、以上述べた、トランスジェニック動物に関しては、例えば、村松正實、岡山博人、山本雅編集、『実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック』、1996年、羊土社発行、269乃至283頁に、その手法が詳述されている。一方、トランスジェニック植物を得るための方法も、斯界では種々確立されている。例えば、常法にしたがって、植物への感染性を有するアグロバクテリウム属微生物の『Tiプラスミド』などのプラスミドをベクターとして用いて、斯かるベクターにこの発明のDNAを組み込み、得られる組換えDNAを植物体や植物のプロトプラストに導入したり、重金属の微粒子をこの発明のDNAでコートし、斯かる微粒子をパーティクルガンを用いて植物体や植物のプロトプラストに直接注入することにより効率よくDNAを導入することができる。宿主植物としては種々のものを用いることができるが、ジャガイモ、大豆、小麦、大麦、米、トウモロコシ、トマト、レタス、アルファルファ、リンゴ、桃、メロンなどの食用の植物は、この発明のペプチドの、ヒトによる摂取に際しての安全性の面から有用である。斯くして得られる植物体ないしは植物のプロトプラストに、ハイブリダイゼーション法やPCR法を適用して所期のDNAを含むものを選択し、プロトプラストの場合にはそれを植物体として再生させれば、この発明のDNAを導入してなるトランスジェニック植物を得ることができる。なお、トランスジェニック植物を得るための手法に関しては、ジェーン・ケイ・セトロウ編集、『ジェネティック・エンジニアリング』、第16巻、1994年、プレナム・プレス発行、93乃至113頁に種々概説されている。

【0036】この発明のペプチドは、当該ペプチドをコードするDNAを発現させる工程と、当該工程により生成したペプチドを採取する工程を含むこの発明の製造方法により所望量を製造することができる。当該DNAは、通常、先述のようにして得られる、当該ペプチドをコードするこの発明のDNAを導入してなる形質転換体細胞や、トランスジェニック動物又はトランスジェニック植物を、培養、飼育乃至栽培する工程で発現される。形質転換体細胞の培養に用いる培地としては、形質転換体細胞を培養するための慣用の培養培地を用いればよく、斯かる培養培地は、通常、緩衝水を基材とし、これにナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、燐イオン、塩素イオンなどの無機イオンと、宿主の代謝能力に応じた微量元素、炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミンなどを加え、必要に応じて、さらに血清、

ホルモン、細胞成長因子、細胞接着因子などを含有せしめて構成される。個々の培養培地としては、例えば、Lブロス培地、Tブロス培地、199培地、DMEM培地、Ham's F12培地、IMDM培地、MCDB104培地、MCDB153培地、MEM培地、RD培地、RITC80-7培地、RPMI-1630培地、RPMI-1640培地、WAJC404培地などが挙げられる。斯かる培養培地に形質転換体を約 1×10^4 乃至 1×10^7 個/ml、望ましくは、約 1×10^5 乃至 1×10^6 個/ml接種し、必要に応じて新鮮な培養培地と取替えながら、温度37℃前後で1日乃至1週間、望ましくは、2乃至4日間浮遊培養又は単層培養すると、当該ペプチドを含む産物としての培養物が得られる。形質転換体の種類や培養条件にもよるが、斯くして得られる培養物は、通常、1l当たり当該ペプチドを約1 μ g乃至100mg含む。

【0037】一方、先述のようにして得られる、この発明のDNAを導入してなるトランスジェニック動物の飼育ないしはトランスジェニック植物の栽培により、この発明のDNAを発現させる場合には、当該動物ないし植物を慣用の方法により飼育ないし栽培し、導入したDNAの形態、例えば、それに含まれるプロモーターやエンハンサーなどに応じて、適宜の外部刺激を与えた後、所望の組織・器官や、血液、乳及び骨髓液を含む体液などを採取する。斯くしてこの発明のペプチドを含む産物が得られる。斯くして得られる産物は、通常、新鮮重量1g当たり当該ペプチドを約1ng乃至100 μ g含む。

【0038】このようにして得られたこの発明のペプチドを含む培養物ないし産物は、必要に応じて、超音波、細胞溶解酵素及び／又は界面活性剤により菌体又は細胞を破碎した後、濾過、遠心分離などにより当該ペプチドを含む画分を菌体若しくは細胞又はそれらの破碎物から分離し、引き続いて、当該ペプチドを精製して用いることができる。精製には、生理活性蛋白質を精製するための斯界における慣用の方法が適用される。斯かる方法の具体例としては、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などが挙げられる。これらの方法を適用して分離される画分を、この発明のペプチドが有する所期の性質、例えば、IL-18の中和能や、IL-18への結合能、分子量、等電点などについて試験し、所期の性質を示した画分を採取すれば、当該ペプチドは精製することができる。そして、最終使用形態に応じて、精製ペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。なお、この発明のペプチドが、特定の物質に親和性を示すアミノ酸配列を含有している場合は、斯かる親和性物質を利用してこの発明のペプチド

を精製することもできる。例えば、この発明のペプチドが数個のヒスチジンからなるアミノ酸配列を含有する場合、斯かる配列はニッケルイオンに親和性を示すので、当該ペプチドはニッケルイオンの固定化された水不溶性担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製することができる。また、この発明のペプチドはIL-18に特異的に結合するので、IL-18の固定化された水不溶性担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーもこの発明のペプチドの精製に有用である。

【0039】斯くして得られるこの発明のペプチドはIL-18の生理作用を中和する性質を具備する。同じ特許出願人による特許第2724987号公報及び特開平8-27189号公報などに、免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生の誘導能や、キラー細胞の生成の誘導能、キラー細胞の細胞障害性の増強能が記載されているように、IL-18は多面的な生理作用を有することが明らかとなっている。また、過剰なIL-18は生体における炎症を惹起する場合がある。この発明のペプチドはこのようなIL-18の生理作用を中和し、斯かる生理作用に起因する生体における炎症の惹起を抑制し得る。

【0040】この発明のペプチドは、ヒトを含む哺乳類において、免疫系を活性化するIL-18の生理作用を中和して免疫反応を抑制して調節する性質を有するので、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。免疫系は、本来、有害な異物から生体を防御するためのものであるが、ときとして、その働き故に、却って、生体に有害な結果をもたらすことがある。哺乳類に、例えば、腎臓、肝臓、心臓、骨髓、血液などの臓器や皮膚、角膜、血管、心臓弁などの組織を移植すると、同種異系抗原に対する拒絶反応や免疫反応により、T細胞が活性化され、リンパ球が増殖したり、炎症が生じることがある。症状の程度こそ違え、同様の現象は、例えば、アレルゲンのように、宿主が固有のものと見做さない異種異系抗原が侵入した場合にも観察される。自己免疫疾患においては、本来、固有のものと見做されるべき成分がアレルギー反応を惹起する。この発明のペプチドは、ヒトを含む哺乳類に投与すると、斯かる免疫反応を抑制又は調節し、それらに起因する各種疾患の治療・予防に著効を発揮する。したがって、この発明でいう感受性疾患とは免疫反応の亢進に起因する疾患であって、この発明のペプチドが直接又は間接に作用して治療又は予防し得るすべての疾患ということになり、個々の感受性疾患としては、例えば、上記のごとき移植に伴う拒絶反応や、移植片対宿主疾患、高IL-18血症を伴う諸疾患、悪性貧血、萎縮性胃炎、インスリン抵抗性糖尿病、ウェジナー肉芽腫症、円板状エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、寒冷凝集素症、グッドパスチャー症候群、クローン病、交感性眼炎、甲状腺機能亢進症、若

年性糖尿病、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、進行性全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、多発性寒冷血色素尿症、多発性筋炎、多発性結節性動脈炎、多発性硬化症、特発性アジソン病、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病、白血球減少症、血球貪食症候群、ベーチェット病、早発性更年期、慢性関節リウマチ、成人スチル病、スチル病、リウマチ熱、慢性甲状腺炎、ホジキン病、HIV感染症、喘息、アトピー性皮膚炎、接触皮膚アレルギー、アレルギー性鼻炎、花粉症及びハチ毒アレルギーを含む自己免疫疾患、アレルギー性疾患及び免疫不全症が挙げられる。なお、この発明のペプチドは、IFN- α の過剰産生や過剰投与などに起因する敗血症ショックの治療や予防にも有効である。また、この発明のペプチドは、例えば、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、中毒性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、劇症肝炎、ウイルス性肝硬変、アルコール性肝硬変、中毒性肝硬変、胆汁性肝硬変、胆汁うっ滞性肝障害、肝細胞癌、急性肝炎、脂肪肝、肝臓腫瘍、肝血管障害などの肝疾患、胆管炎、胆嚢炎、原発性硬化性胆管炎、胆嚢腫瘍、胆管腫瘍などの胆嚢・胆道疾患、急性膵炎、慢性膵炎、膵機能不全、膵臓腫瘍及び膵嚢胞などの膵疾患、急性腎炎、慢性腎不全、腎癌、腎虚血、腎結石、糸球体腎炎、糸球体炎、糸球体硬化などの腎臓並びに糸球体疾患の治療・予防、さらには、それらの疾患に伴う、例えば、食欲不振、倦怠感、疲労感、腹痛、背痛、黄疸、発熱、肝性脳症、腹水、出血傾向などの症状を緩和又は解消する効果もある。その際、例えば、プロトポルフィリン、チオプリン、マロチラート、肝臓加水分解物、グリチルリチン、ジクロロ酢酸ジイソプロピルアミン、メチルメチオニンスルホニウムクロリド、グルタチオン、タウリン、シアニダノール、インターフェロン、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、チオクト酸、小紫胡湯、大紫胡湯、紫胡桂枝湯、アスパラギン酸、甘草、メチオニンなどの肝細胞の機能を促進する薬剤を併用してもよい。また、生体内において、IL-18がFasリガンドの産生を増強したり、逆に、FasリガンドがIL-18の細胞からの分泌を誘導する場合があるので、この発明のペプチドは、Fas及びFasリガンドが関与する免疫疾患一般の治療・予防にも有効である。加えて、この発明のペプチドは、虚血、虚血性心筋症、脳虚血、脳底動脈片頭痛、脳底部異常血管網症、脳卒中、脳底部動脈瘤、動脈硬化症、血管内皮障害、糖尿病、腸管膜血管閉塞症及び上腸管膜動脈症候群を含む循環器系疾患、パーキンソン病、脊髄筋肉萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、痴呆症、脳血管性痴呆症、エイズ痴呆症及び脳脊髄炎を含む神経系疾患の症状を緩和したり、予防する効果もある。

【0041】斯くして、有効成分としてこの発明のペプチドを含んでなる感受性疾患剤は、上記のごとき感受性

疾患を治療・予防するための抗自己免疫疾患剤、抗アレルギー剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、増血剤、白血球増多剤、血小板増多剤、鎮痛剤、解熱剤、肝機能改善剤などとして多種多様な用途を有することとなる。剤型並びに感受性疾患の種類及び症状にもよるが、この発明の感受性疾患剤は、通常、液状、懸濁状、ペースト状又は固形状に調製され、この発明のペプチドを0.00001乃至100% (w/w)、望ましくは、0.0001乃至20% (w/w) 含んでなる。

【0042】この発明の感受性疾患剤は、当該ペプチド単独の形態はもとより、それ以外の生理的に許容される、例えば、担体、賦形剤、希釈剤、アジュバント、安定剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の1若しくは複数種類との組成物としての形態をも包含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、ラクチトールなどの糖質及びクエン酸塩若しくはリン酸塩を主体とする緩衝剤が、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、FK506、グルココルチコイド、シクロフォスファミド、ナイトロゲンマスタード、トリエチレンチオフォスファミド、ブズルファン、フェニラミンマスタード、クロランブシル、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、6-アザグアニン、8-アザグアニン、フルオロウラシル、シタラビン、メトトレキサート、アミノプテリン、マイトマイシンC、塩酸ダウノルビシン、アクチノマイシンD、クロモマイシンA3、塩酸ブレオマイシン、塩酸ドキソルビシン、サイクロスポリンA、L-アスパラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ヒドロキシウレア、塩酸プロカルバジン、副腎皮質ホルモン、金製剤などの他に、IL-18以外のサイトカインの受容体アンタゴニストやIL-18以外のサイトカインの中和剤、例えば、インターロイキン-1受容体蛋白質、インターロイキン-2受容体蛋白質、インターロイキン-5受容体蛋白質、インターロイキン-6受容体蛋白質、インターロイキン-8受容体蛋白質及びインターロイキン-12受容体蛋白質に対するそれぞれの抗体、さらには、TNF- α 受容体、TNF- β 受容体、インターロイキン-1受容体、インターロイキン-5受容体及びインターロイキン-8受容体に対するそれぞれのアンタゴニストなどが挙げられる。

【0043】さらに、この発明の感受性疾患剤は投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、当該ペプチドを、例えば、1回当りの用量又はその整数倍(4倍まで)若しくはその約数(1/40まで)に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、錠剤、カプセル剤、外用剤などが挙げられる。当

該疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与してもよく、いずれの場合にも感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。当該疾患剤の用量は、通常は、感受性疾患患者の体内のIL-18レベルに基づき選定される。体内のIL-18レベルは、例えば、患者より採取される血液、関節液及び骨髓液などの体液や尿などの生物学的試料を、同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に記載の検出方法や、特開平10-96730号公報に記載の診断方法などに供して測定することができる。測定値を、同様にして測定される健常者における基準値と比較すれば、斯かる患者の体内におけるIL-18の過剰量が推測される。斯くして推測される、患者におけるIL-18の過剰量を中和し得る量のこの発明のペプチドを含む当該疾患剤をその患者に投与すればよい。IL-18を中和し得るこの発明のペプチドの量は、当該ペプチドの形態やその投与経路により異なるが、通常は、IL-18の量に対してモル比で1/2ないしはそれ以上である。斯くして選定される用量の当該疾患剤を、感受性疾患の種類・症状や、過剰なIL-18の検出された部位を勘案して、1度に又は2度以上に分けて、経口投与するか皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。当該疾患剤は、通常は、当該ペプチド量として成人当たり約1 μ g乃至1g/回、より望ましくは、約10 μ g乃至100mg/回の用量で、1乃至4回/日又は1乃至5回/週の頻度で1日乃至1年間に亘って投与される。

【0044】ところで、この発明のペプチドをコードするDNAは、いわゆる、「遺伝子療法」にも有用である。すなわち、通常の遺伝子療法においては、この発明のDNAを、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルス由来のベクターに挿入するか、カチオン性ポリマーや膜融合型リポソームなどのリポソームに包埋し、この状態で、生体内での過剰なIL-18に起因する疾患に罹患した患者に直接注入するか、あるいは、患者からリンパ球を採取し、生体外で導入した後、患者に自家移植するのである。また、養子免疫遺伝子療法においては、効果細胞にこの発明のDNAを通常の遺伝子療法の場合と同様にして導入すると、例えば、腫瘍細胞やウイルス感染細胞などの標的細胞に対する効果細胞の細胞障害性が高まり、養子免疫療法を強化することができる。さらに、腫瘍ワクチン遺伝子療法においては、患者から摘出した腫瘍細胞にこの発明のDNAを通常の遺伝子療法の場合と同様にして導入し、生体外で一定数に達するまで増殖させた後、患者に自家移植するのである。移植された腫瘍細胞は患者体内においてワクチンとして作用し、強力且つ抗原特異的な抗腫瘍免疫を発揮する。斯くして、この発明のDNAは、例えば、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、感染症及び免疫不全症を始めとする各種疾患の遺伝子療法、さらには、臓器移植やアレルギー性疾患に伴う拒絶反応や過剰

な免疫反応の抑制に著効を発揮することとなる。なお、これらの遺伝子療法を実施するための一般的手順は、例えば、島田隆、斉藤泉、小澤敏也編集、『実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ 遺伝子治療の基礎技術』、1996年、羊土社発行にも詳述されている。

【0045】また、この発明のペプチドには、IL-18を認識し、結合して、その生理作用を中和ないし阻害する性質があるので、当該ペプチドを有効成分とするこの発明の中和剤及び阻害剤並びに、IL-18に当該ペプチドを作用させるこの発明の中和方法及び阻害方法は、IL-18の過剰産生やIL-18の過剰投与に起因する種々の疾患の治療に有用である。さらに、この発明のペプチドはIL-18を認識し、結合する性質があるので、当然のことながら、IL-18を精製したり検出するためのアフィニティークロマトグラフィーや標識アッセイにおいても有用である。また、これに加え、この発明のペプチドは、IL-18に対する作動薬や拮抗薬の、生体内又は生体外での検索にも有用である。

【0046】以下、この発明の実施の形態につき、実施例を挙げて説明する。なお、以下の実施例1乃至3において用いられる手法は斯界において慣用のものであり、例えば、黒木登志夫、谷口克、押村光雄編集、『実験医学別冊細胞工学ハンドブック』、1992年、羊土社発行や横田崇、新井賢一編集、『実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ3 遺伝子クローニング実験法』、1993年、羊土社発行などにも詳述されている。

【0047】

【実施例1】〈ペプチド及びそれをコードするDNA〉

【0048】

【実施例1-1】〈抗IL-18抗体の選択〉

【0049】

【実施例1-1(a)】〈抗IL-18抗体を産生するハイブリドーマの選択〉同じ特許出願人による特許第2724987号公報に記載の、形質転換体によるポリペプチドの製造方法にしたがって、配列表における配列番号21に示すアミノ酸配列有するヒトIL-18としてのポリペプチドを調製した。同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に記載の方法にしたがって、このポリペプチドを抗原として用いてBALB/cマウスを免疫感作し、免疫感作されたマウスより脾細胞を調製した。引き続き、特開平8-231598号公報に記載の方法に準じて、得られた脾細胞をマウス骨髓種由来のSp2/O-Ag14細胞(ATCC CRL-1581)との融合反応に供してハイブリドーマを生成させ、これをマイクロプレートに適量ずつ分注した後、37℃で1週間培養した。

【0050】引き続き、同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に記載の方法にしたがって、各ウェルのハイブリドーマの培養上清と先に得たヒトIL-18との反応性をエンザイムイムノアッセイにより調

べ、斯かる反応性ある培養上清を産生したハイブリドーマに限界希釈法を適用して、抗ヒトIL-18抗体を産生する、数種類のハイブリドーマの単一クローンを得た。

【0051】得られたハイブリドーマの単一クローンを96ウェルマイクロプレートの個々のウェルで常法にしたがって培養した後、それぞれの培養上清のIL-18中和能を判定した。IL-18中和能は、IL-18の生理作用のひとつである、免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生誘導に対する被験試料の阻害効果を調べることににより判定した。免疫担当細胞としてヒト急性骨髄性白血病患者の骨髄細胞に由来するKG-1細胞(ATCC CCL-246)を用い、被験試料として上記培養上清を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.4)により各種の適宜の倍率に希釈して得た希釈物を用いた。先ず、常法にしたがって、予め所期の細胞数に達するまで増殖させたKG-1細胞を、細胞密度 3×10^6 個/mlになるように10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.4)に浮遊させ、96ウェルマイクロプレートにウェル当たり0.1mlずつ分注した。一方、上記で得たヒトIL-18の5ng/ml溶液0.05mlと、被験試料のいずれか又は対照として10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.4)0.05mlとを混合した後、各ウェルに添加した。37℃で5%CO₂インキュベーター中24時間インキュベートした後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生されたIFN- γ の量を通常の酵素免疫測定法により測定した。IFN- γ の標準品として、米国国立公衆衛生研究所から入手したヒトIFN- γ (Gg23-901-530)を用いた。その結果、いくつかのハイブリドーマの培養上清が、対照に認められたIL-18によるIFN- γ の産生の誘導を、用量依存的に、極めて顕著に阻害することが判明した。これらのうち、とりわけ強い阻害能を示したハイブリドーマの単一クローンを選択し、『#125-2H』と命名した。

【0052】

【実施例1-1(b)】〈抗IL-18抗体の調製〉実施例1-1(a)で選択したハイブリドーマのクローン『#125-2H』を、同じ出願人による特開平8-231598号公報に記載の方法にしたがって、BALB/cマウスの腹腔内で増殖させた。マウスより腹水を採取し、引き続き特開平8-231598号公報に記載の方法にしたがって、腹水より、ハイブリドーマ『#125-2H』の産生した単一クローン抗体を精製した。常法にしたがって分析したところ、この単一クローン抗体は、IgG₁のクラスに属するものであった。実施例1-1(a)に記載のIL-18中和能の判定法に準じて試験したところ、この単一クローン抗体は、極めて効果

的に且つ用量依存的にIL-18によるKG-1細胞(ATCC CCL-246)におけるIFN- γ の産生誘導を阻害するものであり、IL-18中和抗体であることが確認された。斯くして得た単一クローン抗体を『#125-2HmAb』と命名した。

【0053】

【実施例1-2】〈抗IL-18抗体における可変領域のアミノ酸配列〉実施例1-1(a)で得たハイブリドーマのクローン『#125-2H』を、常法にしたがって、10% (v/v) ウシ血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.4)に浮遊させ、培養規模を拡大しながら5%CO₂インキュベーター中で培養した。所期の細胞密度に達した時点で、培養した細胞を微量反応管に採取した後、燐酸食塩緩衝液(以下、「PBS」と記す。)で細胞を3回洗浄し、再度新鮮なPBSに懸濁した。細胞懸濁物を新たな微量反応管に、一本当たり 5×10^6 個の細胞数となるように採り、バイオテクス社製のRNA調製用試薬『ウルトラスペック LS II』を1mlずつ添加し懸濁した。この懸濁物にクロロホルムを微量反応管当たり0.2ml添加し、15秒間攪拌後、氷上で5分間保持した。遠心分離して形成される上層を採取し、これと等量の2-プロパノールを添加・混合した後、氷上で5分間保持した。遠心して上清を除去し、沈澱を、75% (v/v) エタノール水溶液で2回洗浄し、減圧乾燥し、滅菌蒸留水に溶解して、『#125-2H』由来の全RNA画分を得た。この画分を一部とり、260nmにおける吸光度を測定してRNA濃度を算出した。

【0054】2本の微量反応管に上記で得た全RNAをそれぞれ1 μ gとり、滅菌蒸留水を添加して反応管当りの全量を10.1 μ lとした。これらの微量反応管を70℃で5分間保持し、氷上で冷却した後、常法にしたがい逆転写酵素反応に供した。いずれの微量反応管も、反応液量は20 μ lとし、反応液中の各成分の終濃度は、5mM MgCl₂、10mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.3)、50mM KCl、1.25mM dNTPミックス、0.01 μ g/ μ l ランダムヘキサデオキシリボヌクレオチド、2mM ジチオトレイトール、0.875単位/ μ l RNaseインヒビター、及び10単位/ μ l 逆転写酵素とした。温度は、25℃で10分間、42℃で30分間及び99℃で5分間の順で制御した後、4℃にまで冷却した。

【0055】次に、常法にしたがい、上記の2本の反応管で得た逆転写酵素反応産物をそれぞれ鋳型として用いる2種類のPCR反応、すなわち、抗体の軽鎖における可変領域をコードするcDNA断片を増幅するためのPCR反応(以下、「PCR反応A」と言う。)及び、抗体の重鎖の可変領域をコードするcDNA断片を増幅するためのPCR反応(以下、「PCR反応B」と言う。)を行った。プライマーとしてのオリゴヌクレオチ

ドは、エス・タラン・ジョーンズら『バイオテクノロジー』、第9巻、88乃至89頁(1991年)に記載されたPCRプライマーを参考にしてデザインし、常法にしたがって調製した。PCR反応Aで用いたセンスプライマーは配列表における配列番号23に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスプライマーは配列表における配列番号24に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドであった。PCR反応Bで用いたセンスプライマーは配列表における配列番号25に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスプライマーは配列表における配列番号26に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドであった。PCR反応の液量は、A、Bいずれも100 μ lとした。PCR反応A及びBにおける反応液中の各成分の終濃度は、いずれも、10mMKC1、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.8)、2mM MgCl₂、0.1% (w/v) トリトンX-100、10 μ g/ml ウシ血清アルブミン、0.125mM dNTPミックス、適量の上記センスプライマー、適量の上記アンチセンスプライマー、及び0.025単位/ μ l Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン製)とした。温度制御は、PCR反応A、Bともに、94℃で1分間、60℃で1分間及び72℃で1分間の順でインキュベートするサイクルを40回とした。

【0056】それぞれのPCR反応産物より、増幅されたcDNAを通常のポリエチレングリコール沈澱により採取し、その一部を、ストラタジーン製『pCR-Script Cam SK (+) クローニングキット』を用い、添付の説明書にしたがって操作して、プラスミドベクター『pCR-Script Cam SK (+)』との連結反応に供した。連結反応産物の一部で、ストラタジーン製大腸菌コンピテントセル『XL1-Blue MRF' Kan』株を、添付の説明書にしたがい操作して形質転換した。形質転換した大腸菌を、30 μ g/mlクロラムフェニコールを含むL寒天平板培地に接種し、37℃で一晩静置培養した。生成したコロニーを、30 μ g/mlクロラムフェニコールを含むLブロス培地にそれぞれ接種し、37℃で一晩振盪培養した。培養物より菌体を採取し、常法により、菌体より組換えDNAを採取した。通常のリボ核酸法により塩基配列を解読したところ、PCR反応Aに由来する組換えDNAは配列表における配列番号27に示す塩基配列を、PCR反応Bに由来する組換えDNAは配列表における配列番号28に示す塩基配列を含有しており、それぞれの塩基配列はそこに併記したアミノ酸配列をコードしていることが判明した。

【0057】抗体の軽鎖及び重鎖における可変領域は、通常、4種類の枠組構造が3種類のCDRを介して連結してなる、互いに類似した構造を有している。また、同種抗体同士の場合、一般に、枠組構造のアミノ酸配列は

比較的よく保存されているのに対して、CDRのアミノ酸配列は抗体ごとに多様性が見られる。そこで、上記で明らかにしたアミノ酸配列と、マウス抗体についてすでに報告されている可変領域のアミノ酸配列とを比較・照合することにより、単クローン抗体『#125-2HmAb』の軽鎖及び重鎖における可変領域と、それぞれにおけるCDRのアミノ酸配列の決定を試みた。その結果、当該抗体の軽鎖における可変領域は、配列表における配列番号27に併記したアミノ酸配列における第21乃至128番目のアミノ酸からなる配列、すなわち、配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、重鎖における可変領域は、配列表における配列番号28に併記したアミノ酸配列における第20乃至132番目のアミノ酸からなる配列、すなわち、配列番号2に示すアミノ酸配列を有すると結論された。また、当該軽鎖における3種類のCDRは、それぞれ、配列表における配列番号3乃至5に示すアミノ酸配列を、当該重鎖における3種類のCDRは、それぞれ、配列表における配列番号6乃至8に示すアミノ酸配列を有すると結論された。なお、以上の配列番号1乃至8に示すアミノ酸配列をコードする、ハイブリドーマ『#125-2H』由来のDNAの塩基配列は、それぞれ、配列表における配列番号11乃至18に示されている。

【0058】

【実施例1-3】〈ペプチド及びそれをコードするDNA〉

【0059】

【実施例1-3(a)】〈DNA、組換えDNA及び形質転換体の調製〉実施例1-2で明らかにした、単クローン抗体『#125-2HmAb』の軽鎖及び重鎖における可変領域のアミノ酸配列、すなわち、配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する、scFvとしてのペプチドをコードするDNAを、通常のリボ核酸工学的手法を組み合わせて以下のようにして調製した。まず、実施例1-2に記載の方法にしたがって、ハイブリドーマ『#125-2H』由来の全RNAを調製し、全RNAを2本の微量反応管内で逆転写酵素反応に供した。引き続き、それぞれの反応産物を鋳型に用い、別個のPCR反応、すなわち、配列表における配列番号12に示す塩基配列を含むDNA断片を増幅するための反応(以下、「PCR反応C」と言う。)、及び、配列表における配列番号11に示す塩基配列の一部を含有するDNA断片を増幅するための反応(以下、「PCR反応D」と言う。)を行った。PCR反応Cにおいて、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、配列表における配列番号29及び30に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた。PCR反応Dにおいて、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは、それぞれ、配列表における配列番号31及び32に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを用

いた。これらのプライマーは、いずれも実施例1-2で明らかにした塩基配列に基づきデザインし、常法にしたがって調製したオリゴヌクレオチドである。PCR反応C及びDにおける各成分の組成は、いずれも、実施例1-3に記載のPCR反応Aの場合と同一とした。温度制御は、いずれも、94℃で1分間、35℃で1分間及び72℃で1分間の順でインキュベートするサイクルを3回繰り返した後、94℃で1分間、60℃で45秒及び72℃で1分間インキュベートするサイクルを32回繰り返す、その後4℃で保持した。

【0060】実施例1-2に記載の方法にしたがって、PCR反応C及びDの産物より増幅されたDNAを採取し、採取したDNAをプラスミドベクター『pCR-Script Cam SK (+)』との連結反応に供し、連結反応産物で大腸菌を形質転換し、形質転換体を培養し、培養物から組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により分析して、PCR反応C及びD由来の組換えDNAが、それぞれ配列表における配列番号12の塩基配列及び配列番号11の塩基配列の一部を含有することを確認した。PCR反応C由来の組換えDNAを制限酵素Nde I及びBamHIで、PCR反応D由来の組換えDNAを制限酵素BamHIで東洋紡販売のプラスミドベクター『pET-3a』を制限酵素Nde I及びBamHIで消化した。これらの消化物の適量ずつを微量反応管に合一した後、混合物を宝酒造製ライゲーションキット『ライゲーション・キット・バージョン2』を用いて添付の説明書にしたがい操作して連結反応を行った。常法にしたがい連結反応産物で宝酒造製大腸菌コンピテントセル『JM109』株を形質転換し、形質転換体を培養し、培養物から組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により分析して、斯かる組換えDNAが、配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列をコードする配列番号19に示す塩基配列を含有することを確認し、『pEscFv#125-2H』と命名した。配列番号9に示すアミノ酸配列は、単一クローン抗体『#125-2HmAb』の重鎖における可変領域のアミノ酸配列（配列番号2）、グリシン及びセリンからなるリンカーとしてのアミノ酸配列、及び同抗体の軽鎖における可変領域のアミノ酸配列（配列番号1）の一部が、N末端からこの順で連結されてなるものである。図1に示すように、組換えDNA『pEscFv#125-2H』においては、T7プロモーター及びリボゾーム結合配列の下流に、開始コドン、配列番号19に示す塩基配列及び終止コドンがこの順で連結されていた。常法にしたがい、組換えDNA『pEscFv#125-2H』で東洋紡販売の大腸菌コンピテントセル『BL21 (DE3) pLys S』株を形質転換し、斯かる組換えDNAの導入された形質転換体を得た。この形質転換体を『EscFv#125-2H』と命名した。

【0061】

【実施例1-3 (b)】〈形質転換体によるペプチドの製造〉常法によりLブロス培地中で37℃で振盪条件下一晩前培養した、実施例1-3 (a) で得た形質転換体『EscFv#125-2H』の培養物を、500ml容三角フラスコに調製した100mlの、50μg/ml アンピシリン及び30μg/ml クロラムフェニコールを含むTブロス培地に1ml接種し、培養物の600nmにおける吸光度（セル幅1cm）を測定しつつ、37℃で振盪培養した。吸光度が約0.5に達した時点で、培養物にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（以下、「IPTG」と略記する。）を終濃度0.4mMになるように添加し、引き続き約5時間培養を継続した。

【0062】培養物から菌体を遠心分離により回収し、-80℃で凍結させた。凍結菌体を解凍し、0.5M尿素及び0.1M NaH₂PO₄を含む0.01M トリス緩衝液（pH8.0）（以下、単に「0.5M尿素溶液」と言う。）に懸濁し、超音波処理した後、37℃で1時間振盪して菌体を破碎した。遠心分離により菌体破碎物から不溶性画分を回収して封入体含有画分を得た。封入体含有画分を、0.5M尿素溶液に懸濁し、超音波処理し、0.5M尿素溶液で洗浄して、洗浄封入体画分を得た。洗浄封入体画分を6.0M尿素及び0.1M NaH₂PO₄を含む0.01M トリス緩衝液（pH8.0）で可溶化した。遠心分離して残存する不溶物を除去した後、可溶化物を、担体としてアマシャムファルマシアバイオテック製『スーパーデックス75HR10/30』を用い、溶離液としてPBSを用いるゲル濾過で分離し、溶出したボイド画分を回収した。回収した画分を8.0M尿素を含むPBSに対して透析して蛋白質成分を変性させた後、透析外液の尿素濃度を下げることにより、変性蛋白質成分を再生させる操作を数回繰り返した。引き続いて、透析物を先述の方法に準じてゲル濾過により分離し、分子量約25乃至30キロダルトンに相当する画分を採取した。採取した画分の液量は約2ml、蛋白質成分の含量は約100μg/mlであった。通常のプロテシム硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、「SDS-PAGE」と言う。）で分析したところ、採取した画分は、分子量約29キロダルトンのペプチドを約95%以上の純度で含んでいた。

【0063】

【実施例1-3 (c)】〈ペプチドによるIL-18の生理作用の中和〉実施例1-3 (b) で得たペプチド含有画分を、10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地で、1200、7200又は43200倍希釈し、これら希釈物のIL-18中和能を実施例1-1に記載のIL-18の中和能の判定方法にしたがって調べた。結果を図2に示す。

【0064】図2に見られるように、実施例1-3

(b) で得たペプチド含有画分は、対照に見られる、IL-18の生理作用によるKG-1細胞におけるIFN- γ の産生の誘導を用量依存的に阻害した。斯かるペプチドのSDS-PAGEで見積もられた分子量は、配列表における配列番号9に示すアミノ酸配列の計算上の分子量(約25キロダルトン)に見合うものである。以上の実施例1-1乃至1-3(c)に示した結果は、実施例1-3(b)で得たペプチドが、抗IL-18抗体である単クローン抗体における可変領域のアミノ酸配列としての、配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有する、IL-18の生理作用を中和する、人為的に創製されたこの発明のペプチドであることを示している。また以上の結果は、実施例1-3(a)で得たDNAは、この発明のペプチドをコードする、この発明のDNAであり、実施例1-3

(b)に見られるように、斯かるDNAを用いるこの発明のペプチドの製造方法によれば、斯かるペプチドが良好に製造できることを示している。

【0065】

【実施例1-3(d)】〈ペプチドのIL-18への特異的結合〉実施例1-1(a)に記載の方法で調製したヒトIL-18を常法にしたがって¹²⁵Iで標識し、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミンを含むPBS(以下、「BSA/PBS」と言う。)で希釈し、¹²⁵I標識ヒトIL-18濃度が8ng/ μ lの¹²⁵I標識ヒトIL-18溶液を調製した。2本の微量反応管それぞれに、この¹²⁵I標識ヒトIL-18溶液0.5 μ l、及び実施例1-3(b)で得た、この発明のペプチドを含有する、分子量約25乃至30キロダルトンに相当するゲル濾過画分6.5 μ lを注入した。一方の微量反応管に3 μ lのBSA/PBSを、残る一方の微量反応管に3 μ gの未標識ヒトIL-18を含む3 μ lのBSA/PBSをさらに注入した後、両微量反応管を4℃で1時間振盪した。それぞれに0.5 μ lのピアース製架橋試薬『BS³』の4mM水溶液を加えて氷上で30分間静置して架橋反応に供した。それぞれに0.5 μ lの1Mトリス緩衝液(pH7.5)を加え15分間静置して反応を終結した。反応産物を分子量マーカーとともに、還元剤としてDTTを用いる通常のSDS-PAGEに供し、泳動後のゲルを常法にしたがってオートラジオグラフィーに供した。結果を図3に示す。

【0066】図3に見られるように、未標識のIL-18未添加の系には、分子量約44キロダルトンの位置に顕著なバンドが認められた。この結果は、実施例1-3(b)で得た、計算上の分子量約25キロダルトンのこの発明のペプチドと、計算上の分子量約18キロダルトンの¹²⁵I標識ヒトIL-18がおおよそ1対1のモル比で結合したことを示している。そして、このバンドが過剰量の未標識のIL-18の添加により消失したことから、実施例1-3(b)のペプチドはヒトIL-18と

特異的に結合するものであることが判明した。実施例1-3(d)と実施例1-3(c)の結果は、この発明のペプチドがIL-18に特異的に結合することによってその生理作用を中和することを示している。

【0067】

【実施例2】〈ペプチド及びそれをコードするDNA〉

【0068】

【実施例2-1】〈DNA、組換えDNA及び形質転換体の調製〉アンチセンスプライマーとして、常法にしたがって調製した、配列表における配列番号33に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いたこと以外は、実施例1-3(a)に記載のPCR反応Dと同一の条件でPCR(以下、「PCR反応E」と言う。)を行った。これと並行して、実施例1-3(a)に記載のPCR反応Cと同一の条件でPCRを行った。

【0069】実施例1-3(a)に記載の方法にしたがって、PCR反応C及びEの産物から増幅されたDNAを採取し、採取したDNAをプラスミドベクター『pCR-Script Cam SK(+)]との連結反応に供し、反応産物で大腸菌を形質転換し、形質転換体を培養し、培養物から組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により分析して、PCR反応C及びE由来の組換えDNAが、それぞれ配列表における配列番号12の塩基配列及び配列番号11の塩基配列の一部を含有することを確認した。PCR反応C由来の組換えDNAを制限酵素Nde I及びBamHIで、PCR反応E由来の組換えDNAを制限酵素BamHIで、実施例1-3(a)で用いたプラスミドベクター『pET-3a』を制限酵素Nde I及びBamHIで消化し、これらの消化物の適量ずつを微量反応管に合一した後、混合物を宝酒造製ライゲーションキット『ライゲーション・キット・バージョン2』を用いて添付の説明書にしたがい操作して連結反応を行った。常法にしたがい、連結反応産物で宝酒造製大腸菌コンピテントセル『JM109』株を形質転換し、形質転換体を培養し、培養物から組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により分析して、斯かる組換えDNAが、配列表における配列番号10に示すアミノ酸配列をコードする配列番号20に示す塩基配列を含有することを確認し、『pEscFv#125-2H.H.T』と命名した。配列番号10に示すアミノ酸配列は、単クローン抗体『#125-2HmAb』の重鎖における可変領域のアミノ酸配列(配列番号2)、グリシン及びセリンからなるリンカーとしてのアミノ酸配列、同抗体の軽鎖における可変領域のアミノ酸配列(配列番号1)の一部、及びヒスチジンが6個連なった配列が、N末端からこの順で連結されてなるものである。図4に示すように、組換えDNA『pEscFv#125-2H.H.T』においては、T7プロモーター及びリボゾーム結合配列の下流に、開始コドン、配列番号20に示す塩基配列、及び終止コドンがこの順で連結されていた。

常法にしたがい、組換えDNA『pEscFv#125-2H.HT』で、実施例1-3(a)で用いた大腸菌コンピテントセル『BL21(DE3)pLysS』株を形質転換し、斯かる組換えDNAの導入された形質転換体を得た。この形質転換体を『EscFv#125-2H.HT』と命名した。

【0070】

【実施例2-2】〈形質転換体によるペプチドの製造〉
実施例1-3(b)における形質転換体『EscFv#125-2H』の培養法に準じて、実施例2-1の方法で得た形質転換体『EscFv#125-2H.HT』を100mlの培養規模で培養した。引き続き、実施例1-3(b)に記載の方法にしたがって培養物から菌体を回収し、菌体を破碎して封入体含有画分を得、封入体画分を洗浄して洗浄封入体画分を得た。洗浄封入体画分に6M塩酸グアニジンを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)(以下、単に「6M塩酸グアニジン溶液」と言う。)を同画分の液量に対して10%加え、4℃で一晩攪拌して封入体を可溶化した。得られた可溶化物を、予め6M塩酸グアニジン溶液で平衡化したキアジェン製アフィニティークロマトグラフィー用ゲル『Ni-NTAアガロース』(5ml)のカラムに負荷し、6M塩酸グアニジン溶液の後、50mM イミダゾール及び6M 尿素を含む25mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)を通液して非吸着物を除去した。その後、カラムに250mM イミダゾール及び6M 尿素を含む25mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)を通液して吸着物を溶出させ回収した。回収した画分を6M 尿素を含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)で蛋白質成分の濃度0.1mg/ml以下にまで希釈し、0.4M L-アルギニン塩酸、2mM EDTAを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)(以下、「TEA緩衝液」と言う。)に対して4℃で透析して蛋白質成分を再生させた。この透析操作を3回繰り返した後、10mM 酸化型グルタチオンを含むTEA緩衝液に対して4℃で6日間透析した。透析物を限外濾過膜を用いて濃縮し、さらにPBSに対して透析した。通常の、SDS-PAGEにより分析したところ、得られた透析物は、分子量約29キロダルトンのペプチドを約95%以上の純度で含むものであった。透析物を凍結乾燥し、約1mgの当該ペプチドを含む固状物を得た。

【0071】上記で得た固状物を、10%(v/v)ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で適宜の各種のペプチド濃度になるように溶解して被験試料とし、実施例1-3(c)に記載の方法にしたがってIL-18中和能を試験した。また、別途、実施例1-1(b)の方法で得た単クローン抗体『#125-2HmAb』を上記と同じ組成の培地で適宜の各種の抗体濃度になるように希釈して被験試料とし、同様にIL-18中和能を

試験した。対照に認められたIFN- γ 産生量に対する、被験試料添加系におけるIFN- γ 産生量の百分率を求め阻害率とした。結果を図5に示す。

【0072】図5に見られるように、本実施例で得たペプチドは、用量依存的に、IL-18の生理作用によるKG-1細胞におけるIFN- γ の産生誘導を効果的に阻害した。斯かるペプチドのSDS-PAGEで見積もられた分子量は、配列表における配列番号10に示すアミノ酸配列の計算上の分子量(約26キロダルトン)に見合うものである。以上の結果は、斯かるペプチドが、抗IL-18抗体における可変領域のアミノ酸配列としての、配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列の一部又は全てを含有し、IL-18の生理作用を中和する、人為的に創製された、この発明のペプチドであることを示している。さらに、図5の結果は、本実施例で得たこの発明のペプチドが、抗IL-18単クローン抗体『#125-2HmAb』のおよそ2倍のモル濃度で、斯かる抗体と同程度のIL-18中和能を発揮したことを示している。斯かる抗体がIgG₁に属し、1分子当たり2個の抗原結合部位を有するのに対し、本実施例によるこの発明のペプチドは1分子当たり1個の抗原結合部位を有するものと想定される。したがってこの結果は、本実施例によるこの発明のペプチドがもとの抗体と同程度に効果的にIL-18を中和すること、並びに、配列表における配列番号1及び2のアミノ酸配列の一部又は全てが、IL-18を中和するペプチドの人為的な創製に極めて有効に用い得ることを示している。また以上の結果は、本実施例で得たDNAは、この発明のペプチドをコードするこの発明のDNAであり、斯かるDNAを用いるこの発明のペプチドの製造方法によれば、この発明のペプチドが良好に製造できることを示している。なお、実施例1-3(d)に準じてIL-18に対する結合性を調べたところ、本実施例の方法で得られるペプチドも同様に、IL-18に特異的に結合することが確認された。

【0073】

【実施例3】〈ペプチド及びそれをコードするDNA〉
キメラ抗体としての形態のこの発明のペプチドは以下のようにして調製する。先ず、ヒトイムノグロブリンの軽鎖(κ 鎖)の定常領域をコードする塩基配列を含むDNAを、ピー・エー・ハイターら、『セル』、第22巻、197乃至207頁(1980年)に記載の方法にしたがって、ヒト遺伝子ライブラリーより単離する。次に、単離したDNAを鋳型として、通常のPCRにより、実質的に軽鎖の定常領域をコードする塩基配列のみからなるDNA(「ヒト軽鎖定常領域DNA」という。)を得る。引き続き、実施例1-2に記載のPCR反応Aに準じてPCRを行い、配列表における配列番号27における第1乃至384番目の塩基からなる配列を有するDNA(「マウス軽鎖可変領域DNA」という。)を得

る。これらのヒト軽鎖定常領域DNA及びマウス軽鎖可変領域DNAを鋳型として、ロバート・エム・ホートンら、『メソッズ・イン・エンザイモロジー』、第217巻、270乃至279頁(1993年)に記載の『オーバーラップ・エクステンション法』を適用して、マウス軽鎖可変領域DNAの下流にヒト軽鎖定常領域DNAが連結され、5'末端及び3'末端部分に制限酵素認識配列を含んでなるDNAを得る。一方、発現ベクターとして、『pSV2-neo』(ATCC 37149)などのような、大腸菌における複製起点、哺乳類の細胞内で機能するプロモーター及び/又はエンハンサー、それらの制御下に位置する制限酵素認識配列、選択配列などを含むDNAを準備する。この発現ベクターと、上記で得たヒト軽鎖定常領域DNA及びマウス軽鎖可変領域DNAを含むDNAとを、それぞれ、制限酵素で切断した後、混合し、リガーゼを用いて連結して、キメラ抗体の軽鎖をコードするDNAを含んでなる組換えDNAを得る。

【0074】これとは別途、IgGのクラスに属するヒトイムノグロブリンの重鎖(γ 鎖)の定常領域をコードする塩基配列を含むDNAを、エヌ・タカハシら、『セル』、第29巻、671乃至679頁(1982年)に記載の方法にしたがって、ヒト遺伝子ライブラリーより単離する。単離したDNAにおいて、重鎖の定常領域をコードする部分は、当該論文に記載のとおり、4個の独立したエクソンからなる。単離したDNAを鋳型として、前記『オーバーラップ・エクステンション法』を適用して、4個のエクソンを連結してなるDNA(「ヒト重鎖定常領域DNA」という。)を得る。引き続いて、実施例1-2に記載のPCR反応Bに準じてPCRを行い、配列表における配列番号28における第1乃至423番目の塩基からなる配列を有するDNA(「マウス重鎖可変領域DNA」という。)を得る。これらのヒト重鎖定常領域DNA及びマウス重鎖可変領域DNAを鋳型として、前記『オーバーラップ・エクステンション法』を適用して、マウス重鎖可変領域DNAの下流にヒト重鎖定常領域DNAが連結され、5'末端及び3'末端部分に制限酵素認識配列を含んでなるDNAを得る。一方、発現ベクターとして、『pSV2-gpt』(ATCC 37145)などのような、大腸菌における複製起点、哺乳類の細胞内で機能するプロモーター及び/又はエンハンサー、それらの制御下に位置する制限酵素認識配列、選択配列などを含むDNAを準備する。この発現ベクターと、上記で得たヒト重鎖定常領域DNA及びマウス重鎖可変領域DNAを含むDNAとを、それぞれ、制限酵素で切断した後、混合し、リガーゼを用いて連結して、キメラ抗体の重鎖をコードするDNAを含んでなる組換えDNAを得る。

【0075】次に、以上の、キメラ抗体の軽鎖及び重鎖をコードするDNAをそれぞれ含んでなる組換えDNA

を、CHO-K1細胞(ATCC CCL-61)などの哺乳類の株化細胞にエレクトロポレーション法により同時に導入する。DNAの導入の結果得られる細胞群を、発現ベクターにおける選択配列に基づいて選択し、選択された細胞をそれぞれ培養する。それぞれの培養上清につき、実施例1-3(c)に記載の方法によりIL-18の生理作用の中和能の有無を調べる。所期の中和能が認められた培養上清の由来する細胞に限界希釈法を適用し、単一細胞とし、キメラ抗体の形態のこの発明のペプチドを産生する形質転換体を得る。この形質転換体を、培養規模を拡大しつつ培養して、その培養上清から、通常の抗体の精製方法にしたがい抗体を精製し、キメラ抗体の形態のこの発明のペプチドを得る。斯くして得られるこの発明のペプチドは、抗IL-18単クローン抗体『#125-2HmAb』と同様に、効果的にIL-18の中和能を発揮する。また、本実施例にしたがって得られるペプチドの枠組構造と相同性を有するヒト起源の抗体の枠組構造をデータベースを用いて検索し、相同性の認められたヒト起源の枠組構造と同様のアミノ酸配列を有するよう、本実施例によるDNAを改変し、発現させれば、ヒト起源の枠組構造を有するヒト化抗体としてのペプチドが得られる。さらに、斯くして得られるヒト化抗体のアミノ酸配列に基づいて、慣用の蛋白質構造解析用のソフトウェアを用いてその立体構造を予測し、抗IL-18単クローン抗体『#125-2HmAb』のアミノ酸配列から同様にして予測される立体構造と比較し、『#125-2HmAb』により近い立体構造を持つようにさらにDNAを改変し、発現させれば、『#125-2HmAb』と実質的に同等の機能を発揮するヒト化抗体が得られる。本実施例にしたがって得られるペプチド並びに、斯かるペプチドを改変して得られるヒト化抗体としての形態のペプチドは、感受性疾患の治療に有用である。

【0076】

【実施例4】〈液剤〉安定剤として林原製結晶トレハロース粉末『トレハオース』を1%(w/v)含む生理食塩水に、実施例1及び2の方法にしたがって得たいずれかのペプチドを濃度1mg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密ろ過により除菌して液剤を得た。

【0077】安定性に優れた本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤、点鼻剤などとして有用である。

【0078】

【実施例5】〈乾燥注射剤〉安定剤としてシュークロスを1%(w/v)含む生理食塩水100mlに実施例1及び2の方法にしたがって得たいずれかのペプチド100mgを溶解し、常法にしたがって精密ろ過により除菌した後、バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥した後、密栓した。

【0079】安定性に優れた本品は、自己免疫疾患を含

む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

【0080】

【実施例6】〈軟膏剤〉滅菌蒸留水に和光純薬工業製カルボキシビニルポリマー『ハイビスワコー104』と林原製結晶トレハロース粉末『トレハオース』をそれぞれ濃度1.4% (w/w) 及び2.0% (w/w) になるように溶解し、実施例1及び2の方法にしたがって得たいずれかのペプチドを均一に混合した後、pH7.2に調整して、1g当りこの発明のペプチドを約1mg含むペースト状物を得た。

【0081】延展性と安定性に優れた本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための軟膏剤として有用である。

【0082】

【実施例7】〈錠剤〉林原製無水結晶 α -マルトース粉末『ファイントース』に実施例1及び2の方法により得たいずれかのペプチドと細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られた混合物を常法により打錠して製品1錠(約200mg)当りこの発明のペプチド及びルミンをそれぞれ約1mg含む錠剤を得た。

【0083】摂取性、安定性に優れ、細胞賦活作用も有する本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【0084】

【実験】〈急性毒性試験〉常法にしたがって、8週齢のマウスに実施例4乃至7の方法により得た種々剤型の感

受性疾患剤を経皮、経口又は腹腔内に注射投与した。その結果、被検試料のLD₅₀は、ペプチドの量に換算すると、いずれの投与経路によっても約1mg/kgマウス体重以上であった。このことは、この発明のペプチドがヒトを含む哺乳類に投与する医薬品に配合して安全であることを裏付けている。

【0085】

【発明の効果】以上説明したとおり、この発明はIL-18の生理作用を効果的に中和するペプチドの人為的な創製に基づくものである。この発明のペプチドは、ヒトを含む哺乳類において免疫反応を抑制し調節する性質を有するので、臓器移植に伴う拒絶反応の緩和や、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。さらに、この発明のペプチドを用いる阻害剤、阻害方法、中和剤、中和方法は、IL-18が直接又は間接に関与する種々の疾患の治療や、臓器移植に伴う拒絶反応や過剰な免疫反応の抑制にも有効である。斯くも有用なるこの発明のペプチドは、この発明の製造方法により所望量を容易に製造することができる。加えて、この発明のペプチドは、IL-18に対する作動薬や拮抗薬を検索するための試薬としても有用である。

【0086】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると言える。

【0087】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabuhiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> PEPTIDE

<130> 10058804

<150> JP 177,580/98

<151> 1998-6-24

<150> JP 289,044/98

<151> 1998-10-12

<150> JP 365,023/98

<151> 1998-12-22

<160> 33

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Lys

20

25

30

Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys Arg
 100 105

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ala

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Lys Leu Tyr
 1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
 1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Phe Ile Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Asp

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gly Leu Arg Phe

1

<210> 9

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially produced peptide in the form of a single chain variable region fragment (scFv) which neutralizes IL-18

<400> 9

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

130 135 140

Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly

145 150 155 160

Ser Lys Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg

165 170 175
 Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe
 180 185 190
 Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205
 Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser
 210 215 220
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys
 225 230 235

<210> 10

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially produced peptide in the form of a single chain
 variable region fragment (scFv) which neutralizes IL-18

<400> 10

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 130 135 140
 Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly
 145 150 155 160
 Ser Lys Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg
 165 170 175
 Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe
 180 185 190
 Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205
 Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser
 210 215 220
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys His His His
 225 230 235 240

His His His

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 11

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc tta tct gcc tct ctg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1           5           10           15
gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gac att ggt agt aaa 96
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Lys
          20           25           30
tta tac tgg ctt caa cag gaa cca gat gga act ttt aaa cgc ctg atc 144
Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg Leu Ile
          35           40           45
tac gcc aca tcc agt tta gat tct ggt gtc ccc aag agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
agt agg tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agc ctt gag tct 240
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
          65           70           75           80
gaa gat ttt gta gac tat tac tgt cta caa tat gct agt tct ccg tac 288
Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr
          85           90           95
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gca ata aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys Arg
          100           105

```

<210> 12

<211> 339

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 12

```

gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
tca gtg aag gtc tcc tgt aag gct tct ggt tac tca ttc act gac tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
          20           25           30
ttc att tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
gga gat att gat cct tat aat ggt gat act agt tac aac cag aag ttc 192
Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
          50           55           60
agg gac aag gcc aca ttg act gtt gac cag tcc tcc acc aca gcc ttc 240
Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr Thr Ala Phe
          65           70           75           80
atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
          85           90           95
gca aga ggc cta cgg ttc tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct 336
Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100           105           110

```

gca 339
Ala
<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 13
cgg gca agt cag gac att ggt agt aaa tta tac 33
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Lys Leu Tyr
1 5 10
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 14
gcc aca tcc agt tta gat tct 21
Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
1 5
<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 15
cta caa tat gct agt tct ccg tac acg 27
Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5
<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 16
ggt tac tca ttc act gac tac ttc att tac 30
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Phe Ile Tyr
1 5 10
<210> 17
<211> 51
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 17
gat att gat cct tat aat ggt gat act agt tac aac cag aag ttc agg 48
Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15
gac 51
Asp
<210> 18
<211> 12
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 18

ggc cta cgg ttc

12

Gly Leu Arg Phe

1

<210> 19

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial DNA to code for the amino acid sequence of SEQ

ID NO:9

<400> 19

gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

tca gtg aag gtc tcc tgt aag gct tct ggt tac tca ttc act gac tac 96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

ttc att tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144

Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

gga gat att gat cct tat aat ggt gat act agt tac aac cag aag ttc 192

Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

agg gac aag gcc aca ttg act gtt gac cag tcc tcc acc aca gcc ttc 240

Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr Thr Ala Phe

65

70

75

80

atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt 288

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

gca aga ggc cta cgg ttc tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct 336

Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

gca ggt gga ggt gga ggc gga tcc ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc 384

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115

120

125

gga tcg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc tta tct gcc tct 432

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

130

135

140

ctg gga gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gac att ggt 480

Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly

145

150

155

160

agt aaa tta tac tgg ctt caa cag gaa cca gat gga act ttt aaa cgc 528

Ser Lys Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg

165

170

175

ctg atc tac gcc aca tcc agt tta gat tct ggt gtc ccc aag agg ttc 576

Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe

180

185

190

agt ggc agt agg tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agc ctt 624

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu

195

200

205

gag tct gaa gat ttt gta gac tat tac tgt cta caa tat gct agt tct 672
 Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser
 210 215 220
 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gca ata aaa 711
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys
 225 230 235
 <210> 20
 <211> 729
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial DNA to code for the amino acid sequence of SEQ
 ID NO:10
 <400> 20
 gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag gtc tcc tgt aag gct tct ggt tac tca ttc act gac tac 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 ttc att tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
 Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga gat att gat cct tat aat ggt gat act agt tac aac cag aag ttc 192
 Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 agg gac aag gcc aca ttg act gtt gac cag tcc tcc acc aca gcc ttc 240
 Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt 288
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gca aga ggc cta cgg ttc tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct 336
 Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 gca ggt gga ggt gga ggc gga tcc ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc 384
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 gga tcg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc tta tct gcc tct 432
 Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 130 135 140
 ctg gga gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gac att ggt 480
 Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly
 145 150 155 160
 agt aaa tta tac tgg ctt caa cag gaa cca gat gga act ttt aaa cgc 528
 Ser Lys Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg
 165 170 175
 ctg atc tac gcc aca tcc agt tta gat tct ggt gtc ccc aag agg ttc 576
 Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe
 180 185 190

agt ggc agt agg tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agc ctt 624
 Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205
 gag tct gaa gat ttt gta gac tat tac tgt cta caa tat gct agt tct 672
 Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser
 210 215 220
 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gca ata aaa cat cac cat 720
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys His His His
 225 230 235 245
 cac cat cac 729
 His His His

<210> 21

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> (73)

<223> "Xaa" means an amino acid of isoleucine or threonine.

<400> 21

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

<210> 22

<211> 157

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> (70)

<223> "Xaa" means an amino acid of methionine or threonine.

<400> 22

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn

1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
 100 105 110
 Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
 115 120 125
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
 130 135 140
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 145 150 155

<210> 23

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as sense primer to amplify a cDNA
 fragment coding for an antibody light chain variable region

<400> 23

actagtcgac atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg

43

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as antisense primer to amplify a cDNA
 fragment coding for an antibody light chain variable region

<400> 24

ggatcccgagg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as sense primer to amplify a cDNA
 fragment coding for an antibody heavy chain variable region

<400> 25

actagtcgac atggratgga gckggrtctt tmtctt

36

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as antisense primer to amplify a cDNA fragment coding for an antibody heavy chain variable region

<400> 26

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 27

<211> 407

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(407)

<220>

<221> sig peptide

<222> (1)...(60)

<400> 27

atg agg gcc cct gct cag att ttt ggc ttc ttg ttg ctc ttg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Ile Phe Gly Phe Leu Leu Leu Leu Phe Pro

1

5

10

15

ggt acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc tta tct 96

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20

25

30

gcc tct ctg gga gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gac 144

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp

35

40

45

att ggt agt aaa tta tac tgg ctt caa cag gaa cca gat gga act ttt 192

Ile Gly Ser Lys Leu Tyr Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Phe

50

55

60

aaa cgc ctg atc tac gcc aca tcc agt tta gat tct ggt gtc ccc aag 240

Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys

65

70

75

80

agg ttc agt ggc agt agg tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc 288

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85

90

95

agc ctt gag tct gaa gat ttt gta gac tat tac tgt cta caa tat gct 336

Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala

100

105

110

agt tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gca ata aaa cgg 384

Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys Arg

115

120

125

gct gat gct gca cca act gta tc 407

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val

130

135

<210> 28

<211> 412

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(412)

<220>

<221> sig peptide

<222> (1)...(60)

<400> 28

```

atg gga tgg agc ggg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga cct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Gly Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Pro Thr Gly
  1           5           10          15
gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
          20          25          30
cct ggg gct tca gtg aag gtc tcc tgt aag gct tct ggt tac tca ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45
act gac tac ttc att tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
Thr Asp Tyr Phe Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
          50          55          60
gag tgg att gga gat att gat cct tat aat ggt gat act agt tac aac 240
Glu Trp Ile Gly Asp Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
          65          70          75          80
cag aag ttc agg gac aag gcc aca ttg act gtt gac cag tcc tcc acc 288
Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Thr
          85          90          95
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          100          105          110
tat ttc tgt gca aga ggc cta cgg ttc tgg ggc caa ggg act ctg gtc 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Leu Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          115          120          125
act gtc tct gca gcc aaa acg aca ccc c 412
Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro
          130          135

```

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as sense primer to amplify a DNA fragment containing the nucleotide sequence of SEQ ID NO:12

<400> 29

```

gtcatatgga gatccagctg cagcagt 27

```

<210> 30

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as antisense primer to amplify a DNA fragment containing the nucleotide sequence of SEQ ID NO:12

<400> 30
gaggatccgc ctccacctcc acctgcagag acagtgacca gag 43
<210> 31
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide as sense primer to amplify a DNA
fragment containing a part of the nucleotide sequence of SEQ ID
NO:11

<400> 31
tggatccggc ggaggtggct ctggcgggtg cggatcggac atccagatga 50
<210> 32
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide as antisense primer to amplify
a DNA fragment containing a part of the nucleotide sequence of
SEQ ID NO:11

<400> 32
ccggatcctt attttattgc cagcttggtc c 31
<210> 33
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide as antisense primer to amplify
a DNA fragment containing a part of the nucleotide sequence of
SEQ ID NO:11

<400> 33
tggatcctta gtgatggtga tggatggtt ttattgccag cttgg 45

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明のペプチドをコードする塩基配列を含有する組換えDNA『pE s c F v # 1 2 5 - 2 H』の構造を示す図である。

【図2】この発明のペプチドが、IL-18の生理作用である、免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生の誘導を、用量依存的に中和する様子を示す図である。

【図3】この発明のペプチドが、IL-18に特異的に結合する様子を示す、ディスプレイ上に表示したSDS-PAGE像の中間調画像である。

【図4】この発明のペプチドをコードする塩基配列を含有する組換えDNA『pE s c F v # 1 2 5 - 2 H . H T』の構造を示す図である。

【図5】この発明のペプチドが、IL-18の生理作用である、免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生の誘導を、用量依存的に中和する様子を示す図である。

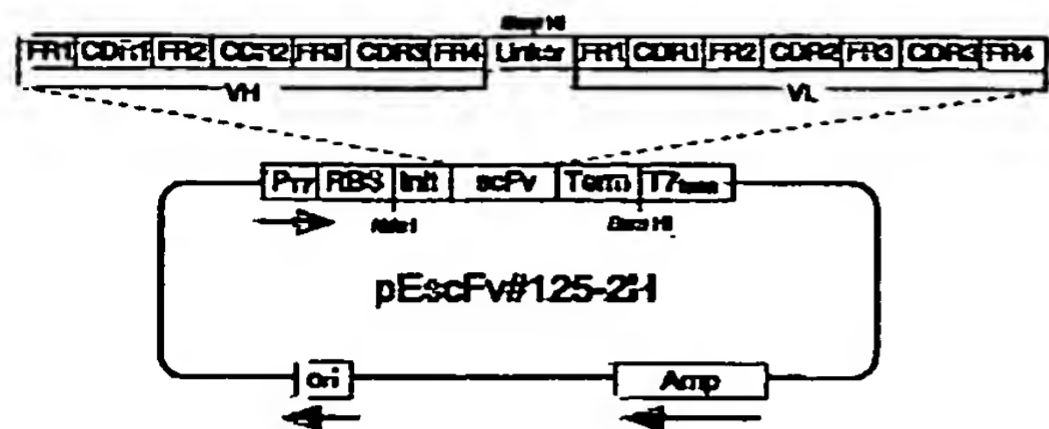
【符合の説明】

P ₁₇	T7プロモーター
RBS	リボゾーム結合配列
Init	開始コドン
s c F v	この発明のペプチドをコードするDNA
A	
VH	抗IL-18抗体の重鎖における可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列
Linker	リンカーとしてのアミノ酸配列をコードする塩基配列
VL	抗IL-18抗体の軽鎖における可変領域のアミノ酸配列の一部をコードする塩基配列
CDR	抗IL-18抗体における相補性決定領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列
FR	抗IL-18抗体における枠組構造のアミノ酸配列をコードする塩基配列
His ₆	ヒスチジン6個が連結されたアミノ酸配列をコードする塩基配列

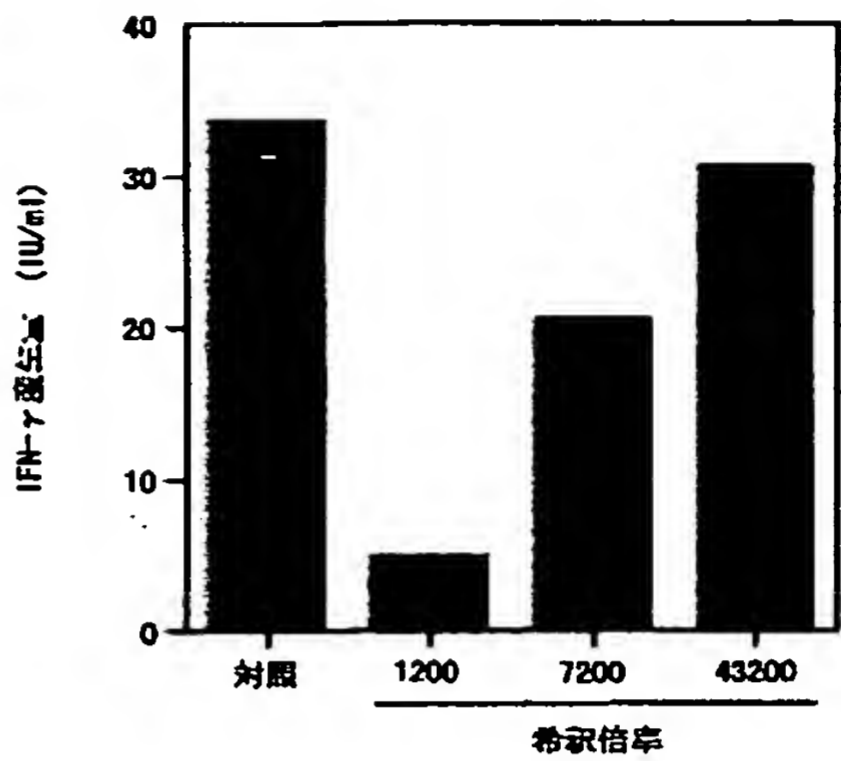
Term 終止コドン
ori 大腸菌における複製起点

Amp アンピシリン耐性遺伝子
T7 term T7ターミネーター

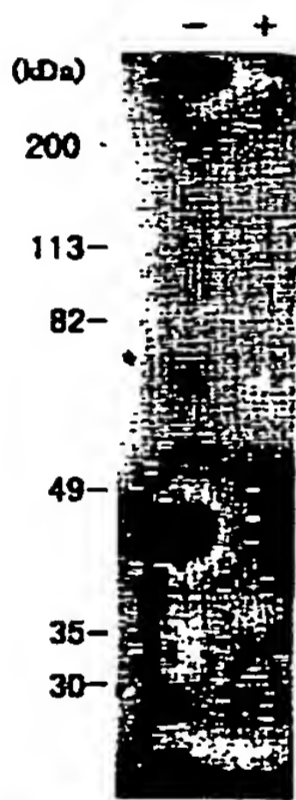
【図1】



【図2】

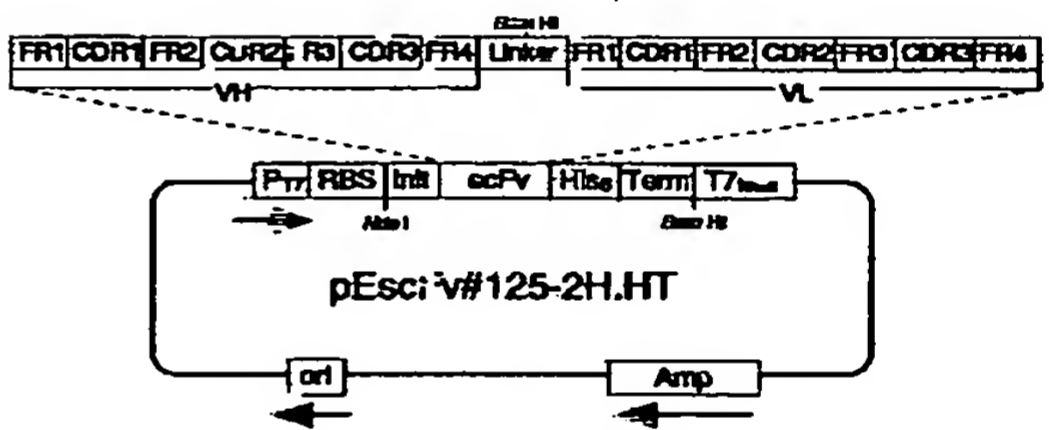


【図3】

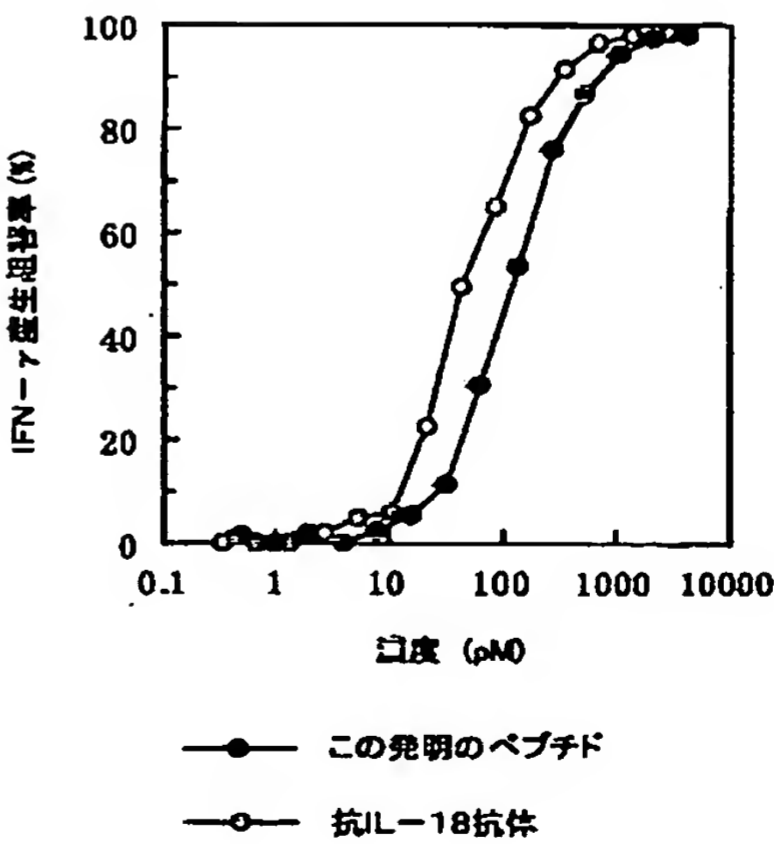


注) レーン左の数字は分子量マーカーの分子量 (単位: キロダルトン) と、それぞれの移動位置を示している。 レーン上、「-」は未標識のIL-18を添加しなかったことを、「+」は未標識のIL-18を添加したことを表している。

【図4】



【図5】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04
DA01 DA02 DA05 EA04 GA11
4B064 AG01 AG27 CA01 CA10 CA11
CA19 CC24 DA03
4C084 AA02 AA06 AA07 BA44 CA53
DA39 DA59 MA66 NA03 ZB072
ZB082 ZB112
4C085 AA13 AA14 BB17 DD62 GG02
GG03 GG04 GG05 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA76 EA22 FA72 FA74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.